

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2002-320666**

(43)Date of publication of application : **05.11.2002**

(51)Int.Cl. A61L 27/00
 A61F 2/14
 C12N 5/06
 // C07K 14/78

(21)Application number : **2001-277064** (71)Applicant : **SANYO CHEM IND LTD**

(22)Date of filing : **12.09.2001** (72)Inventor : **KUROKAWA SUKEHITO**

(30)Priority

Priority number : **2000293084** Priority date : **26.09.2000** Priority country : **JP**

(54) MANUFACTURING METHOD OF ARTIFICIAL CORNEA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a manufacturing method of an artificial cornea having less risk of infection disease such as BSE using an amnion on which ectocornea cells piles up even in a serum-free medium.

SOLUTION: The manufacturing method of the artificial cornea is characterized by culturing cells using polypeptide (A) having at least one minimum amino- acid sequence which exhibits a cell adhesion signal in a molecule.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-320666

(P2002-320666A)

(43) 公開日 平成14年11月5日 (2002.11.5)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード*(参考) |
|---------------------------|-------|---------------|-------------------|
| A 6 1 L 27/00 | | A 6 1 L 27/00 | D 4 B 0 6 5 |
| A 6 1 F 2/14 | | A 6 1 F 2/14 | 4 C 0 8 1 |
| C 1 2 N 5/06 | Z N A | C 0 7 K 14/78 | 4 C 0 9 7 |
| // C 0 7 K 14/78 | | C 1 2 N 5/00 | Z N A E 4 H 0 4 5 |

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2001-277064 (P2001-277064)

(22) 出願日 平成13年9月12日 (2001.9.12)

(31) 優先権主張番号 特願2000-293084 (P2000-293084)

(32) 優先日 平成12年9月26日 (2000.9.26)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002288

三洋化成工業株式会社

京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1

(72) 発明者 黒川 祐人

京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋
化成工業株式会社内

Fターム(参考) 4B065 AA93X BB19 BB25 CA44

4C081 AB21 CA24 EA01

4C097 AA24 CC01 DD05 EE12 EE18

4H045 AA30 CA40 EA20

(54) 【発明の名称】 人工角膜の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 血清を含まない培地（以下、無血清培地）でも角膜上皮細胞が重層化する羊膜を用い、血清由来の狂牛病等の感染症の危険性が少ない人工角膜の製造方法を提供すること。

【解決手段】 細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド

(A) を使用し細胞培養することを特徴とする人工角膜の製造方法を用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列を 1 分子中に少なくとも 1 個有するポリペプチド

(A) を使用し細胞培養することを特徴とする人工角膜の製造方法。

【請求項 2】 (A) と羊膜とを使用して角膜上皮細胞を培養する請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】 細胞培養に使用される培地の血清濃度が 5% (v/v) 未満である請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

【請求項 4】 (A) の細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列の数が 1 分子中 3～50 個である請求項 1～3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 5】 (A) の細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列が、アミノ酸一文字表記で現わされる、RGD 配列、LDV 配列、REDV 配列 (1)、YEKPGSPPREVVPRPRPGV 配列 (2)、KNNQKSEPLIGRKKY 配列 (3)、YIGSR 配列 (4)、PDSGR 配列 (5)、RYVVLPR 配列 (6)、LGTIPG 配列 (7)、RNIAEIIKD I 配列 (8)、IKVAV 配列 (9)、LRE 配列、HHLGGAKQAGDV 配列 (10)、CQEPGGLVVPPTDAP 配列 (11)、DGEA 配列 (12)、GVKGDKNPGWPGAP 配列 (13)、GEFYFDLRLKGDK 配列 (14)、FTLCFR 配列 (15) 及び HAV 配列からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の配列である請求項 1～4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 6】 細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列を 1 分子中に少なくとも 1 個有するポリペプチド (A) と、羊膜と、角膜上皮細胞とからなることを特徴とする人工角膜。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、眼の人工角膜の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、人工角膜の製造方法として、羊膜を基質として血清培地中で角膜上皮細胞を約 3 週間培養し、角膜上皮細胞を羊膜の表面上に接着させ重層化させる人工角膜の製造方法が知られている (眼科、第 42 巻、第 3 号、245～250 頁、2000 年)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 羊膜を基質とした角膜上皮細胞の培養において、使用する培地には血清が含まれるため、人工角膜には血清由来の狂牛病などの感染症の危険性がある。すなわち、本発明の目的は、上記現状に鑑み、血清を含まれない培地 (以下、無血清培地) でも角膜上皮細胞が重層化する羊膜を用い、血清由来の狂牛病などの感染症の危険性が少ない人工角膜の製造方法

を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、鋭意研究を重ねてきた結果、特定のポリペプチドを使用することにより上記目的を達成することを見いだし本発明に到達した。すなわち、本発明の人工角膜の製造方法の特徴は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列を 1 分子中に少なくとも 1 個有するポリペプチド (A) を使用し細胞培養する点にある。

10 【0005】

【発明の実施の形態】 細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列としては、接着シグナルとして働くものであればいずれも使用でき、例えば、「病態生理、第 9 巻第 7 号、527～535 頁、1990 年」や「大阪府立母子医療センター雑誌、第 8 巻 第 1 号、58～66 頁、1992 年」に記載されているものが用いられる。これらの中で、好ましいものは、細胞へ接着性が高い点で、アミノ酸一文字表記で現わされる、RGD 配列、LDV 配列、REDV 配列 (1)、YEKPGSPPREVVPRPRPGV 配列 (2)、KNNQKSEPLIGRKKY 配列 (3)、YIGSR 配列 (4)、PDSGR 配列 (5)、RYVVLPR 配列 (6)、LGTIPG 配列 (7)、RNIAEIIKD I 配列 (8)、IKVAV 配列 (9)、LRE 配列、HHLGGAKQAGDV 配列 (10)、CQEPGGLVVPPTDAP 配列 (11)、DGEA 配列 (12)、GVKGDKNPGWPGAP 配列 (13)、GEFYFDLRLKGDK 配列 (14)、FTLCFR 配列 (15)、HAV 配列及び VTGXG 配列 (16) である。なお、VTXG 配列 (16) 中、X は、未特定のアミノ酸を表す。

【0006】 さらに好ましいものは、細胞へ接着性が高い点で、アミノ酸一文字表記で現わされる、RGD 配列、YIGSR 配列 (4)、PDSGR 配列 (5)、RYVVLPR 配列 (6)、LGTIPG 配列 (7)、RNIAEIIKD I 配列 (8)、IKVAV 配列

(9)、LRE 配列、GVKGDKNPGWPGAP 配列 (13)、GEFYFDLRLKGDK 配列 (14) および HAV 配列であり、最も好ましいものは RGD 配列、IKVAV 配列 (9) 及び HAV 配列である。

【0007】 (A) は、前記最小アミノ酸配列を 1 分子中に少なくとも 1 個有するものである。最小アミノ酸配列が含有されない場合、細胞の羊膜上への接着力が不十分になり細胞の増殖性が悪い傾向にある。この最小アミノ酸配列は、1 分子中に 3～50 個有するものが細胞接着性 (細胞増殖性) がさらに高くなり好ましい。(A) は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列以外のアミノ酸として、GAGAGS 配列 (17) を 1 分子中に 2 個以上有する場合、熱に対する安定性が増し、

(A) 自体をオートクレーブなどの熱滅菌にかけやすくなるために、さらに好ましい。

【0008】(A)の数平均分子量は、細胞に対する接着性の観点から、好ましくは5,000～5,000,000であり、さらに好ましくは10,000～1,000,000、特に好ましくは50,000～500,000である。なお、(A)の数平均分子量は、SDS-PAGE (SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動)法で、(A)を水中で分離し、泳動距離を標準物質と比較することによって求めるものである。(A)の25℃の水に対する溶解度は、0～1,000mg/Lである場合、(A)の疎水性が強く、羊膜と物理吸着法で結合しやすいため好ましい。さらに好ましくは、(A)の25℃の水に対する溶解度が0.01～100mg/Lである。

【0009】(A)の製造方法は、例えば、有機合成法(酵素法、固相合成法及び液相合成法等)、遺伝子組換え法及び生体物質精製抽出法等によって容易に製造できる。これらのうち、(A)のアミノ酸配列が自由に設計でき不純物が少ないという観点から、有機合成法及び遺伝子組換え法が好ましく、さらに好ましくは(A)のアミノ酸配列を容易に設計・製造できるという観点から、

【0010】有機合成法によるポリペプチド(A1)としては、例えば、アミノ酸一文字表記で現される、RGDS配列(18)、GRGDS配列(19)、GRGDSP配列(20)、RGDSPASSKP配列(21)及びこれらポリペプチドの一種以上の重合体等が挙げられる。これらのうち、ポリペプチドの一種以上の重合体

【0011】遺伝子組換え法によるポリペプチド(A2)としては、例えば、アミノ酸一文字表記で現される、(GAGAGS)₉配列(24)とRGD配列とを有するポリペプチド、(GAGAGS)₉配列(24)とYIGSR配列(4)とを有するポリペプチド、(GAP(GPP)₄)₂配列(25)とRGD配列とを有するポリペプチド、(GAP(GPP)₄)₂配列(25)とYIGSR配列(4)とを有するポリペプチド、(GAGAGS)₉配列(24)とIKVAV配列(9)とを有するポリペプチド(特表平3-502935号公報等)等が挙げられる。ポリペプチド(A2)のうち、耐熱性が強く滅菌し易くするために、アミノ酸一文字表記で表されるGAGAGS配列(17)を1分子中に2個以上有するものが好ましく、さらに好ましくは3個以上有するもの、特に好ましくは5個以上有するものであ

る。遺伝子組換え法によるポリペプチド(A2)は、組換え微生物由来の不純物を含むことがあるため、抗ポリペプチド抗体を用いたアフィニティ精製によって精製し、ポリペプチドの純度を80重量%以上にすることが好ましく、さらに好ましくは90重量%以上、特に好ましくは95重量%以上である。遺伝子組換え法に関しては、例えば、特表平3-502935号公報中で例示されている。

【0012】生体物質精製抽出法によるポリペプチド(A3)としては、例えば、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブロイン、フィブリノーゲン、エンタクチン及びアミロイドP等の蛋白質、並びにこれらの分解物等が挙げられる。これらの分解物とは、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列が残存している分解物を意味し、酵素(コラゲナーゼ等)処理、酸(塩酸等)処理、アルカリ(水酸化ナトリウム等)処理又は加水分解等の公知の蛋白質分解方法で得ることができる(例えば、I型コラーゲンを酵素処理することにより、テロペプチドを除いた分解物を得ることができる。)。生体物質精製抽出法に関しては、例えば、特開平4-305600号公報中で例示されている。

【0013】(A)の好ましい具体例としては、三洋化成工業株式会社製のプロネクチンF(細胞接着シグナルRGD配列とGAGAGS配列(17)を、1分子中に各々約13個有する分子量約11万の遺伝子組換え大腸菌により製造されるポリペプチド)及びプロネクチンL

(細胞接着シグナルIKVAV配列とGAGAGS配列を、1分子中に各々約7個有する分子量約9万の遺伝子組換え大腸菌により製造されるポリペプチド)等が挙げられる。

【0014】本発明の製造方法において、(A)は、膜(B)と共に、細胞(C)の培養に供せられることが好ましい。(B)としては、人工角膜製造に用いられる公知のものが使用でき、生体由来の膜及び人工的に作製される膜のいずれもが使用できる。これらのうち、細胞の接着性が高い点で、生体由来の膜が好ましく、さらに血管成分がなく移植後の拒絶反応が起こりにくい点で、羊膜が好ましい。なお、羊膜は、子宮と胎盤の最表層を覆う膜で、出産時に胎盤とともに体外へ出される膜である。

【0015】(C)としては、細胞の重層化がされやすい点で、上皮細胞が好ましく、さらに感染防御を強く果たせる点で、角膜上皮細胞が好ましい。膜(B)を用いる場合、最終の人工角膜では(A)と(B)は結合された状態となれば(A)と(B)の結合方法には特に制限がなく、例えば、「(C)を培養する前に、あらかじめ(A)と(B)を結合させる方法」と「(C)を培養する時に使用する培地に(A)を含有させ、培養中に

(A) と (B) を結合させる方法」等が用いられる。これらのうち、細胞の接着性が高い点で、「(C) を培養する前に、あらかじめ (A) と (B) を結合させる方法」が好ましい。

【0016】 (A) と (B) を結合させる方法としては、例えば、物理吸着（ファンデルワールス吸着等）法及び化学吸着法等が使用できる。物理吸着法としては、例えば、0.0001～10% (w/v) の (A) を含有する水溶液または溶剤等に (B) を浸漬し吸着させる方法や0.0001～10% (w/v) の (A) を含有する水溶液または溶剤等を膜 (B) に塗工する方法等が挙げられる。化学吸着法としては、例えば、マレイミド誘導体、ハロゲン化アリール、イソシアネート、イミドエステル、スクシニジルエステル、グルタルアルデヒド、ジチオスレイトール等の二価性架橋試薬を用いて (A) を (B) に固定化させる方法（例えば、蛋白質・ペプチド・アミノ酸研究用試薬、33～40頁、1988年、ナカライテスク株式会社に記載の方法等）等が挙げられる。

【0017】細胞の培養に用いられる培地としては、人工角膜の製造に使用される公知のものが使用でき、培地には公知の血清を含有させることができる。細胞の培養に使用される培地の血清濃度は、血清由来の狂牛病などの感染症の危険性を下げるために、培地の全容量に対して、5% (v/v) 未満が好ましく、さらに好ましくは0.5% (v/v) 未満であり、特に好ましくは0% (v/v) である。培養温度は、(C) が良好に生育できる温度であれば特に限定されず、通常15～45℃程度である。培養時間は、(C) が良好に生育できる期間であれば特に限定されず、通常1～30日程度である。

【0018】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

実施例1

(1) プロネクチンF結合羊膜 (b) の作製：ポリペプチド (A1) (商品名：プロネクチンF、三洋化成工業株式会社) の1mgを4.5M過塩素酸リチウム水溶液の1mLに溶解し、さらに、塩化ナトリウムを0.85% (w/v) で含有するリン酸緩衝液 (0.02M, pH7.2) で100倍希釈し、プロネクチンF水溶液 (10μg/mL) を作製した。このプロネクチンF水溶液100mLに、約3cm四方のヒト由来羊膜 (a) を投入し、25℃で1時間静置し、プロネクチンFを羊膜 (a) に物理吸着させた。その後、この羊膜を水溶液から取り出し、生理食塩水 (0.85% (w/v)) で洗浄し (100mL×3回)、余分なプロネクチンFを取り除き、プロネクチンF結合羊膜 (b) を得た。

【0019】 (2) 角膜上皮細胞の培養：プロネクチンF結合羊膜 (b) をウェルの底面の大きさに切断し、2

4穴の組織培養用プレート（ベクトン・ディッキンソン株式会社製）のウェルの底面に貼り付けた。次に、角膜上皮細胞用基礎培地（商品名：角膜上皮細胞基礎培地165、カスケード・バイオロジックス社製）の500mLと増殖因子剤（商品名：HCGS増殖添加剤（バイアル瓶入り）、カスケード・バイオロジックス社製）のバイアル瓶の全量とを混和したものを無血清培地 (イ) とし、この無血清培地 (イ) の45mLに牛胎児血清（オリエンタル酵母工業株式会社）の5mLとを混和して10%血清培地 (ロ) としたものを、0.5mL/穴で、羊膜 (a) を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに投入した。また、培地中の正常ヒト角膜上皮細胞の濃度が10万cells/mLの濃度になるように、正常ヒト角膜上皮細胞（商品名：Ocucell HCEC、倉敷紡績株式会社製）を、培地が投入されたプロネクチンF結合羊膜 (b) を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに加えた。プレートにフタをしてゆるやかに攪拌後、CO₂インキュベーター内に静置し、CO₂濃度5% (v/v)、37℃の条件で2週間培養した。10%血清培地 (ロ) は、最初の1週間は1日おきに交換し、次の1週間は毎日交換した。培養後、培地をアスピレーターで吸引し、1mLの生理食塩水で2回洗浄し、実施例1の人工角膜1を得た。

【0020】実施例2

実施例1で使用した10%血清培地 (ロ) を、無血清培地 (イ) の49mLと牛胎児血清の1mLとを混和して2%血清培地 (ハ) (低血清培地) としたものに変更した以外実施例1と同様にして実施例2の人工角膜2を得た。

【0021】実施例3

実施例1で使用した10%血清培地 (ロ) を無血清培地 (イ) に変更した以外実施例1と同様にして実施例3の人工角膜3を得た。

【0022】実施例4

(1) プロネクチンL結合羊膜 (c) の作製：ポリペプチド (A2) (商品名：プロネクチンL、三洋化成工業株式会社) の1mgを4.5M過塩素酸リチウム水溶液の1mLに溶解し、さらに、塩化ナトリウムを0.85% (w/v) で含有するリン酸緩衝液 (0.02M, pH7.2) で100倍希釈し、プロネクチンL水溶液 (10μg/mL) を作製した。このプロネクチンL水溶液100mLに、約3cm四方のヒト由来羊膜 (a) を投入し、25℃で1時間静置し、プロネクチンLを羊膜 (a) に物理吸着させた。その後、この羊膜を水溶液から取り出し、生理食塩水 (0.85% (w/v)) で洗浄し (100mL×3回)、余分なプロネクチンLを取り除き、プロネクチンL結合羊膜 (c) を得た。

【0023】 (2) 角膜上皮細胞の培養：プロネクチンL結合羊膜 (c) をウェルの底面の大きさに切断し、24穴の組織培養用プレート（ベクトン・ディッキンソン

株式会社製)のウェルの底面に貼り付けた。次に、実施例1と同様にして調整した10%血清培地(ロ)を、0.5mL/穴で、プロネクチンL結合羊膜(c)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに投入した。また、培地中の正常ヒト角膜上皮細胞の濃度が10万cells/mLの濃度になるように、正常ヒト角膜上皮細胞(商品名:Ocucell HCEC、倉敷紡績株式会社製)を、培地が投入されたプロネクチンL結合羊膜(c)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに加えた。プレートにフタをしてゆるやかに攪拌後、CO₂インキュベーター内に静置し、CO₂濃度5%(v/v)、37℃の条件で2週間培養した。10%血清培地(ロ)は、最初の1週間は1日おきに交換し、次の1週間は毎日交換した。培養後、培地をアスピレーターで吸引し、1mLの生理食塩水で2回洗浄し、実施例4の人工角膜4を得た。

【0024】実施例5

実施例4で使用した10%血清培地(ロ)を、無血清培地(イ)の49mLと牛胎児血清の1mLとを混和して2%血清培地(ハ)(低血清培地)としたものに変更した以外実施例4と同様にして実施例5の人工角膜5を得た。

【0025】実施例6

実施例4で使用した10%血清培地(ロ)を無血清培地(イ)に変更した以外実施例4と同様にして実施例6の人工角膜6を得た。

【0026】実施例7

(1)フィブロネクチン結合羊膜(d)の作製:ポリペプチド(A3)(商品名:フィブロネクチン、ベクトン・ディッキンソン株式会社)の1mgを、塩化ナトリウムを0.85%(w/v)で含有するリン酸緩衝液(0.02M, pH8.7)の100mLで溶解し、フィブロネクチン水溶液(10μg/mL)を作製した。このフィブロネクチン水溶液100mLに、約3cm四方のヒト由来羊膜(a)を投入し、25℃で1時間静置し、フィブロネクチンを羊膜(a)に物理吸着させた。その後、この羊膜を水溶液から取り出し、生理食塩水(0.85%(w/v))で洗浄し(100mL×3回)、余分なフィブロネクチンを取り除き、フィブロネクチン結合羊膜(d)を得た。

【0027】(2)角膜上皮細胞の培養:フィブロネクチン結合羊膜(d)をウェルの底面の大きさに切断し、24穴の組織培養用プレート(ベクトン・ディッキンソン株式会社製)のウェルの底面に貼り付けた。次に、実施例1と同様にして調整した10%血清培地(ロ)を、0.5mL/穴で、フィブロネクチン結合羊膜(d)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに投入した。また、培地中の正常ヒト角膜上皮細胞の濃度が10万cells/mLの濃度になるように、正常ヒト角膜上皮細胞(商品名:Ocucell HCEC、倉敷紡績株式

会社製)を、培地が投入されたフィブロネクチン結合羊膜(d)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに加えた。プレートにフタをしてゆるやかに攪拌後、CO₂インキュベーター内に静置し、CO₂濃度5%(v/v)、37℃の条件で2週間培養した。10%血清培地(ロ)は、最初の1週間は1日おきに交換し、次の1週間は毎日交換した。培養後、培地をアスピレーターで吸引し、1mLの生理食塩水で2回洗浄し、実施例7の人工角膜7を得た。

【0028】実施例8

実施例7で使用した10%血清培地(ロ)を、無血清培地(イ)の49mLと牛胎児血清の1mLとを混和して2%血清培地(ハ)(低血清培地)としたものに変更した以外実施例7と同様にして実施例8の人工角膜8を得た。

【0029】実施例9

実施例7で使用した10%血清培地(ロ)を無血清培地(イ)に変更した以外実施例7と同様にして実施例9の人工角膜9を得た。

【0030】実施例10

(1)ラミニン結合羊膜(e)の作製:ポリペプチド(A4)(商品名:ラミニン、ベクトン・ディッキンソン株式会社製)の1mgを、塩化ナトリウムを0.85%(w/v)で含有するリン酸緩衝液(0.02M, pH7.2)の100mLで溶解し、ラミニン水溶液(10μg/mL)を作製した。このラミニン水溶液100mLに、約3cm四方のヒト由来羊膜(a)を投入し、25℃で1時間静置し、ラミニンを羊膜(a)に物理吸着させた。その後、この羊膜を水溶液から取り出し、生理食塩水(0.85%(w/v))で洗浄し(100mL×3回)、余分なラミニンを取り除き、ラミニン結合羊膜(e)を得た。

【0031】(2)角膜上皮細胞の培養:ラミニン結合羊膜(e)をウェルの底面の大きさに切断し、24穴の組織培養用プレート(ベクトン・ディッキンソン株式会社製)のウェルの底面に貼り付けた。次に、実施例1と同様にして調整した10%血清培地(ロ)を、0.5mL/穴で、ラミニン結合羊膜(e)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに投入した。また、培地中の正常ヒト角膜上皮細胞の濃度が10万cells/mLの濃度になるように、正常ヒト角膜上皮細胞(商品名:Ocucell HCEC、倉敷紡績株式会社製)を、培地が投入されたラミニン結合羊膜(e)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに加えた。プレートにフタをしてゆるやかに攪拌後、CO₂インキュベーター内に静置し、CO₂濃度5%(v/v)、37℃の条件で2週間培養した。10%血清培地(ロ)は、最初の1週間は1日おきに交換し、次の1週間は毎日交換した。培養後、培地をアスピレーターで吸引し、1mLの生理食塩水で2回洗浄し、実施例10の人工角膜10を得た。

【0032】実施例11

実施例10で使用した10%血清培地(ロ)を、無血清培地(イ)の49mLと牛胎児血清の1mLとを混和して2%血清培地(ハ)(低血清培地)としたものに変更した以外実施例10と同様にして実施例11の人工角膜11を得た。

【0033】実施例12

実施例10で使用した10%血清培地(ロ)を無血清培地(イ)に変更した以外実施例10と同様にして実施例12の人工角膜12を得た。

【0034】比較例1

角膜上皮細胞の培養：ヒト由来羊膜(a)をウェルの底面の大きさに切断し、24穴の組織培養用プレート(ベクトン・ディッキンソン株式会社製)のウェルの底面に貼り付けた。次に、実施例1と同様にして調整した10%血清培地(ロ)を、0.5mL/穴で、羊膜(a)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに投入した。また、培地中の正常ヒト角膜上皮細胞の濃度が10万cells/mLの濃度になるように、正常ヒト角膜上皮細胞(商品名：Ocucell HCEC、倉敷紡績株式会社製)を、培地が投入された羊膜(a)を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに加えた。プレートにフタをしてゆるやかに攪拌後、CO₂インキュベーター内に静置し、CO₂濃度5%、37℃の条件で2週間培養した。10%血清培地(ロ)は、最初の1週間は1日おきに交換し、次の1週間は毎日交換した。培養後、培地を*

*アスピレーターで吸引し、1mLの生理食塩水で2回洗浄し、比較例1の人工角膜13を得た。

【0035】比較例2

比較例1で使用した10%血清培地(ロ)を、無血清培地(イ)の49mLと牛胎児血清の1mLとを混和して2%血清培地(ハ)(低血清培地)に変更した以外比較例1と同様にして比較例2の人工角膜14を得た。

【0036】比較例3

比較例1で使用した10%血清培地(ロ)を無血清培地(イ)に変更した以外比較例1と同様にして比較例3の人工角膜15を得た。

【0037】評価1<ヒト角膜上皮細胞の重層化評価>実施例1～12及び比較例1～3のウェルの羊膜表面の角膜上皮細胞の状態を光学顕微鏡を用いて観察することによって、角膜上皮細胞の重層化を以下の基準により判定し、その結果を表1に示した。

<判定基準>

◎；羊膜表面に角膜上皮細胞が3～5重に重層化している。

○；羊膜表面に角膜上皮細胞が1～2重に重層化している。

△；羊膜表面に角膜上皮細胞が1～2重に重層化しているが、角膜上皮細胞は羊膜表面の一部に留まっている。

×；角膜上皮細胞の重層化が認められない。

【0038】

【表1】

ヒト角膜上皮細胞の重層化評価

| | | ポリペプチド (A) | 血清濃度 %(v/v) | ヒト角膜上皮 細胞の重層化 |
|-------------|----|---------------|----------------|------------------|
| 実 施 例 | 1 | プロネクチンF | 10 | ◎ |
| | 2 | プロネクチンF | 2 | ◎ |
| | 3 | プロネクチンF | 0 | ○ |
| | 4 | プロネクチンL | 10 | ○ |
| | 5 | プロネクチンL | 2 | ○ |
| | 6 | プロネクチンL | 0 | ○ |
| | 7 | フィブロネクチン | 10 | ○ |
| | 8 | フィブロネクチン | 2 | ○ |
| | 9 | フィブロネクチン | 0 | △ |
| | 10 | ラミニン | 10 | ○ |
| | 11 | ラミニン | 2 | ○ |
| | 12 | ラミニン | 0 | △ |
| 比 較 例 | 1 | — | 10 | ○ |
| | 2 | — | 2 | △ |
| | 3 | — | 0 | × |

【0039】評価2<角膜実質細胞の接着性評価>

実施例3、実施例6、実施例9、実施例12及び比較例3の角膜上皮細胞の培養で得られた人工角膜の表面側(角膜上皮細胞培養側)を、24穴の組織培養用プレー

ト(ベクトン・ディッキンソン株式会社製)のウェルの底面に、それぞれ貼り付けた(人工角膜の裏面側が上部になる)。次に、MEMアール液体培地(大日本製薬株式会社製)の445mLと牛胎児血清(オリエンタル

酵母工業株式会社)の50mLと非必須アミノ酸(商品名:MEM用非必須アミノ酸、大日本製薬株式会社製)の5mLとを混和した培地(二)を、0.5mL/穴で、培養羊膜を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに投入した。また、培地中の正常ヒト角膜実質細胞の濃度が10万cells/mLの濃度になるように、正常ヒト角膜実質細胞を、培地が投入された培養羊膜を貼り付けた24穴の組織培養用プレートに加えた。プレートにフタをしてゆるやかに攪拌後、CO₂インキュベータ

*一内に静置し、CO₂濃度5%(v/v)、37℃の条件で1週間培養した。培地(二)は、1日おきに交換した。1週間後に、各穴の培地をアスピレーターで吸引し、0.25%のトリプシン溶液を0.5mL/穴で投入し、10分間静置した後、剥がれたヒト角膜実質細胞の濃度を血球計数板で測定した。その結果を表2に示す。

【0040】

【表2】

人工角膜へのヒト角膜実質細胞の接着性評価

| | | ポリペプチド (A) | 接着したヒト角膜実質細胞の濃度 (×10万cells/mL) |
|------|----|---------------|-----------------------------------|
| 実施例 | 3 | プロネクチンF | 15 |
| | 6 | プロネクチンL | 10 |
| | 9 | フィブロネクチン | 12 |
| | 12 | ラミニン | 9 |
| 比較例3 | | — | 7 |

【0041】本発明の人工角膜の製造方法を用いた場合、低血清培地や無血清培地でもヒト角膜上皮細胞の重層化が得られることが判る。さらに、本発明の製造方法で得られた人工角膜は、ヒト角膜実質細胞との接着性も良好であることが判る。

【0042】

【発明の効果】本発明の人工角膜の製造方法は、無血清培地でも羊膜上で角膜上皮細胞を重層化することが可能※

※であり、血清由来の狂牛病などの感染症の危険性が少ない人工角膜の製造方法を提供することができる。さらにヒト角膜実質細胞との接着性も良好であることより、人工角膜をヒト角膜実質表面に移植する場合、人工角膜と角膜実質の接着が強力で剥がれ難くなる。

【0043】

【配列表】

<110>三洋化成工業株式会社; SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
<120>人工角膜の製造方法
<160>25
<210>1
<211>4
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>1
Arg Glu Asp Val
1
<210>2
<211>19
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>2
Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
1 5 10 15
Pro Gly Val
<210>3
<211>15
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>3
Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Tyr

13

14

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

<210>4
<211>5
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>4
Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5
<210>5
<211>5
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>5
Pro Asp Ser Gly Arg
1 5
<210>6
<211>7
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>6
Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg
1 5

<210>7
<211>6
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>7
Leu Gly Thr Ile Pro Gly
1 5
<210>8
<211>10
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>8
Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile
1 5 10
<210>9
<211>5
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>9
Ile Lys Val Ala Val
1 5
<210>10
<211>12
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>10
His His Leu Gly Gly Ala Lys Gln Ala Gly Asp Val

15

16

1

5

10

<210>11

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>11

Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro

1

5

10

15

<210>12

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>12

Asp Gly Glu Ala

1

<210>13

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>13

Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro

1

5

10

15

<210>14

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>14

Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys

1

5

10

<210>15

<211>6

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>15

Phe Thr Leu Cys Phe Arg

1

5

<210>16

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>16

Val Thr Xaa Gly

1

<210>17

<211>6

<212>PRT

<213>Bombyx mori

<400>17

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

1

5

17

18

<210>18

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>18

Arg Gly Asp Ser

1

<210>19

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>19

Gly Arg Gly Asp Ser

1

5

<210>20

<211>6

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>20

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1

5

<210>21

<211>10

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>21

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro

1

5

10

<210>22

<211>16

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>22

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

1

5

10

15

<210>23

<211>32

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>23

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

1

5

10

15

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

20

25

30

<210>24

<211>54

<212>PRT

<213>Bombyx mori

<400>24

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

19
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala
 20 25 30
 Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ala Gly Ser
 50
 <210>25
 <211>30
 <212>PRT
 <213>Artificial Sequence
 <400>25
 Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 20 25 30